تواجد وخواص متماثلات أنزيم بولي أمين اوكسيديز في نبات الشاي الأخضر *Camellia sinensis*

عمر يونس محمد العباسي[1] و محمد بحري حسن عبد السعدون[2] و شهاب احمد يوسف حسن البجاري[3]

[1] *قسم الكيمياء، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق*

[2] *قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق*

[3] *قسم التحليلات المرضية، المعهد التقني– الموصل، الموصل، العراق*

(تاريخ الاستلام: ٢٠ / ٢ /٢٠٠٧ ، تاريخ القبول: ١٦ / ٥ / ٢٠٠٧)

الملخص

تضمن البحث الكشف عن وجود فعالية انزيم بولي امين اوكسيديز(Polyamine Oxidase (PAO في نبات الشاي الاخضر (Camellia sinensis) ، وتم تحديد الظروف المثلى لفعالية انزيم PAO الخام باستخدام السبرمينSpermine كمادة اساس . وجد ان فعالية انزيم PAO تتناسب طردياً مع زمن التفاعل ولحد(١٢٠)ثانية، وان افضل فعالية كانت باستخدام المحلول المنظم Citric acid-NaOH عند pH=5 وفترة حضن (٥) دقائق ودرجة حرارة (٣٠)°م وحجم انزيم (٢٥٠)مايكروليتر. من خلال رسم لينويفر – بيرك، وجد ان السرعة القصوى التي يعمل بها الانزيم تساوي (٨٣,٣٣)وحدة انزيمية/مل وان قيمة Km تساوي(٢) ملي مولار . ان ايون الليثيوم Li^+ هو اكثر الايونات تحفيزا لفعالية انزيم PAO،حيث ادى الى تحفيز الانزيم بمقدار ٦٣٣,٢٨%. تم تنقية انزيم PAO من نبات الشاي الاخضر بالاستخلاص بالماء المقطر وباستخدام تقنيات الترسيب بكبريتات الامونيوم ،الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب . تم فصل ثلاث متماثلات I, II, III لأنزيم PAO وبفعالية نوعية مقدارها ٥١,٣٦ ، ٦١,٢٦ ، ١٣٨,٨٨ وحدة انزيمية/ملغم بروتين على التوالي وبنقاوة بلغت ٧,١٢ ، ١٥,٦٢ ، ١٤,٢٥ مرة على التوالي مقارنة بالانزيم الخام .تم دراسة بعض خصائص متماثلات انزيمPAO المنقى جزئيا ووجد ان المتماثلين I, III يمتلكان الفة عالية تجاه مادة الاساس السبرمين ، في حين تميز المتماثل II بالفته تجاه البترسين . وبينت النتائج ان المثبط صوديوم فلورايد ادى الى تثبيط كلا من المتماثلين I, III تثبيطا كليا بينما لم يؤثر على فعالية المتماثلII ، اما المثبط ثايوسيميكابازيد فقد اظهر تاثيرا تثبيطيا متفاوتا على فعالية كل من I, III ولم يظهر أي تاثير تثبيطي على المتماثل II .

الكلمات الدالة: بولي امين اوكسيديز، بولي امين، نبات الشاي الأخضر.

المقدمة

مركبات متعددة الامين Polyamines (PA) مركبات نتروجينية ذات وزن جزيئي واطئ متعددة الشحنة الموجبة، وتعد مكونات طبيعية لخلايا بدائية وحقيقية النواة(1). تنتشر مركبات السبرمين Spermine (Spm) ، السبرمدين Spermidine (Spd)، والبترسين Putrescine (Put) في جميع الأنسجة والخلايا الحية، وتكون تراكيزها مرتفعة في الأنسجة النامية مثل الاورام(2). تلعب هذه المركبات دورا مهما في العمليات الايضية للعديد من النباتات من خلال طبيعتها المتعددة القاعدية Polybasic(3)، فضلا عن مساهمتها في نمو وتطور النباتات(4) ، تثبيت الاحماض النووية واغشية الخلايا (5). تتواجد مركبات PA في خلايا النباتات وتقوم بعدة وظائف حياتية كونها تشارك في عملية طرح الأوكسجين عن طريق البناء الضوئي(6) . تم تشخيص كلا من السبرمين و١، ٣–امينو بروبان في بذور الخيار Cucmber وتحديد مستواهما خلال مراحل نمو النبات (7). ان هذه المركبات هي مواد اساس لأنزيم بولي امين اوكسيديز Polyamine Oxidase (PAO) ، الذي يعمل على تنظيم مستوياتها من خلال تحفيزه اكسدة وحذف مجاميع الامين الثانوية لها فيتكون عن ذلك H_2O_2 والألديهليد كنواتج للتفاعل واللذان لهما القدرة على تحفيز موت الخلية، كما ان H_2O_2 له القدرة على عبور الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا، محثا عملية الكرب التأكسدي Oxidative stress (2) درست خواص انزيم PAO في بذور الحمصChick pea ولوحظ انه يظهر فعالية مميزة مع Spd , Spm (8). تم تنقية انزيم PAO في اوراق نبات الشوفان Oat باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني وتبين ان الوزن الجزيئي له باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي SDS-PAGE هو ٦٦(KDa)(9).

ان الهدف من هذا البحث هو الكشف عن وجود فعالية انزيم PAO في نبات الشاي الاخضر ودراسة الظروف المثلى التي تظهر عندها الفعالية القصوى لهذا الانزيم المهم ،ومن ثم تنقية هذا الانزيم ودراسة بعض خواصه.

المواد وطرائق العمل

عزل ودراسة خواص انزيم PAO في نبات الشاي الاخضر:

١. استخلاص الانزيم : اخذ (٢٥٠) غرام من اوراق الشاي الاخضر ، ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (١ وزن : ٣ حجم) وسحقت بآلة الثرم (Blender) لمدة (١٠)دقائق. بعدها جمدت باضافة النتروجين المسال ثم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة .كررت العملية ثلاث مرات، بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي . رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد للتخلص من المواد غير الذائبة لمدة(١٥)دقيقة بسرعة 33520xg للحصول على راشح رائق (10)، قيس حجم الراشح (٣٠٠)مل وحفظ في المجمدة عند(–٢٠)°م لاجراء الخطوات اللاحقة عليه .

٢. فصل البروتين الكلي : فصل البروتين الكلي بواسطة كبريتات الامونيوم وبتشبع (20-60%)، وكانت اضافة كبريتات الامونيوم بصورة تدريجية مع تحريك المزيج بالمحرك الكهربائي عند (٤)°م ولمدة (٦٠) دقيقة. ترك المحلول لمدة (٤٨) ساعة في الثلاجة، تم فصل الراسب عن الراشح بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة(١٥) دقيقة وبسرعة (33520xg). اذيب الراسب في اقل كمية من المحلول المنظم (Citrac

acid-NaOH 20mM , pH=5) لأجراء عملية الفرز الغشائي في الخطوة اللاحقة .

٣. الفرز الغشائي: أجريت عملية الفرز الغشائي لأنزيم PAO بحجم (١٠)مل لمدة ٢٠ ساعة، وفي درجة حرارة (٤)°م وباستخدام المحلول المنظم (Citrac acid-NaOH 20mM , pH=5) مع مراعاة تغيير المحلول المنظم كل ٤ ساعات .

٤. التبادل الايوني: تم تنقية الانزيم الناتج من عملية الفرز الغشائي بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني، اذ استخدم عمود الفصل الزجاجي(٤٠ × ٢,٥ سم)، الحاوي على المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose، وباستخدام المحلول المنظم (Citrac acid-NaOH) بتركيز متدرج Gradient يتراوح بين (15-75 mM) وpH=5. وكانت سرعة جريان المحلول Flow rate من عمود الفصل بمعدل ٤٢ مل/ساعة. تمت متابعة القمم البروتينية المنفصلة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 280nm باستخدام جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية Cecil 1011 ، وتم الاستدلال على القمة البروتينية الحاوية على فعالية انزيم PAO باستخدام الطريقة القياسية لتحديد فعالية الانزيم.

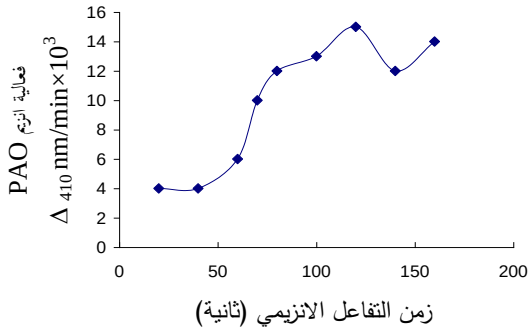
تقدير كمية البروتين الكلي: استخدمت طريقة الباحث لاوري المحورة (12 ,11) لتقدير تركيز البروتين.

قياس فعالية الانزيم : قيست فعالية انزيمPAO اساسا بالاعتماد على الطريقة المبدئية (14,13)، لتحديد الظروف المثلى لفعالية الانزيم . تعتمد الطريقة على متابعة مقدار النقصان في الامتصاصية عند 410nm لمحلول البوتاسيوم فيري سيانيد Pottasium ferricyanide الذي يعمل كمستقبل للأليكترونات، علما ان الامتصاصية المولارية تساوي ٩٦٠ لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$.حددت وحدة فعالية الأنزيم على انها كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من مادة الاساس (السبرمين) في الدقيقة الواحدة.

النتائج والمناقشة

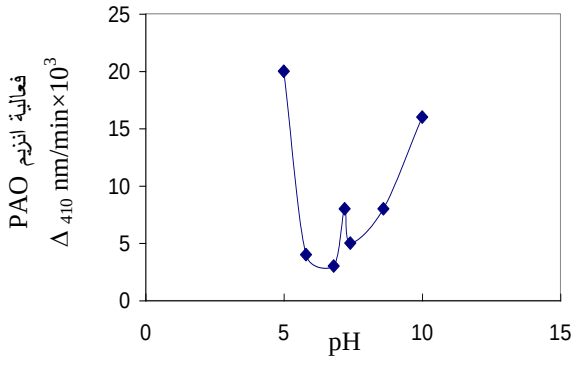
تحديد الظروف المثلى لعمل انزيم PAO الخام :

حددت الظروف المثلى لفعالية انزيم PAO الخام الشاي الاخضر ، ووجد ان سرعة التفاعل الانزيمي تتناسب طردياً مع زمن التفاعل ولغاية(١٢٠)ثانية بعدها لوحظ انخفاض في الفعالية شكل(١)، وهذا يختلف لما وجدت عليه سرعة التفاعل الانزيمي في الحليب والمصل وخلا يا الدم الحمر اذ ازدادت لغاية (٦٠) ثانية (15,14).



شكل رقم (١) تاثير الزمن على سرعة التفاعل الانزيمي

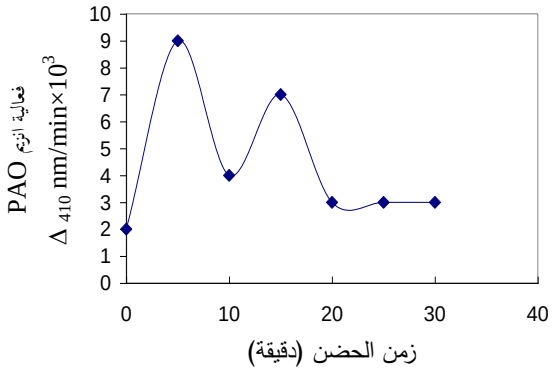
كما اظهرت النتائج ان اعلى فعالية للانزيم كانت عند الدالة الحامضية pH=5 للمحلول المنظم (Citric acid-NaOH 20mM ,pH=5) شكل(٢) وهذا مشابه لأنزيم PAO المنقى من حبوب الشعير اذ كانت pH المثلى تساوي ٥ (16)، وقيمة pH المثلى في براعم الشعير بلغت 4 ولنفس المحلول المنظم(17)، وهي تختلف عن التي وجدت في الخلايا السرطانية للقولون اذ كانت تساوي٩ (18).



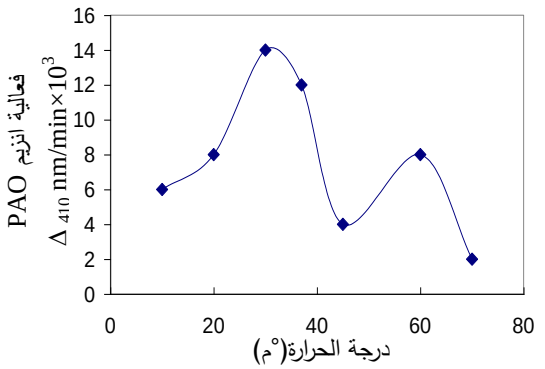
شكل رقم(٢) تاثير الدالة الحامضية على فعالية انزيم PAO

Citric acid-NaOH pH=5
Citric acid –trisodium citrate pH=5.8
NaH_2PO_4-$KH2PO_4$ pH=6.8
NaH_2PO_4-$KH2PO_4$ pH=7.2
NaH_2PO_4-$KH2PO_4$ pH=7.4
Tris-HCL pH=8.6
$NaHCO_3$-NaOH pH=10

وقد اظهر أنزيم PAO أعلى فعالية عند حضنه لمدة(٥) دقائق شكل(٣)، ودرجة حرارة (٣٠)°م كما في شكل (٤)



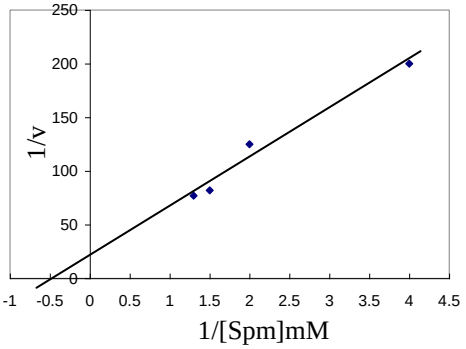
شكل رقم (٣) تاثير زمن الحضن على فعالية انزيم PAO



شكل رقم (٤) تاثير درجة الحرارة على فعالية انزيم PAO

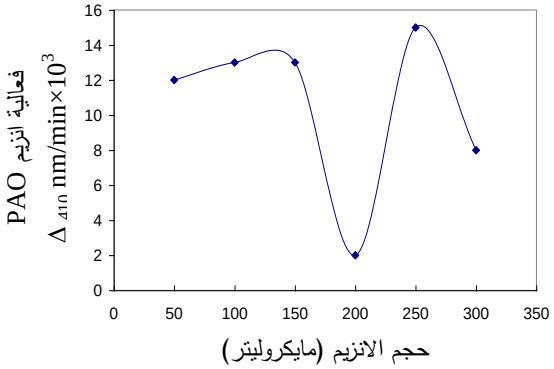
وتبين من الدراسات السابقة ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم في السائل المخي ألشوكي كانت (٣٧)°م (١٤) ، وهي اقل بكثير من تلك التي وجدت

في مصل الأمهات الحوامل والتي كانت (٥٥)°م.(19) . كما تم دراسة تأثير تركيز مادة الأساس على فعالية الانزيم ، ولوحظ ان التركيز الامثل لمادة الاساس السبرمين كان(١٠٠) ملي مولار ، واظهر رسم لينويفر–بيرك شكل(٥)



شكل رقم (٥) رسم لينويفر–بيرك لأنزيم PAO في نبات الشاي

ان قيمة Vmax و Km كانت(٨٣,٣٣) وحدة انزيمية/مل و(٢) ملي مولار على التوالي ، وهي اعلى من قيمة Kmلأنزيم PAO المنقى من حبوب الشعير باستخدام مادة الأساس السبرمين والتي كانت تساوي(١) ملي مولار(١٧). يبين الشكل (٦) تأثير زيادة حجم الأنزيم(تركيز البروتين) على فعالية الأنزيم، اذ بلغت سرعتها القصوى عند حجم(٢٥٠) مايكروليتر من المحلول الانزيمي الخام للشاي الاخضر وهي اكثر من تلك في الحليب وخلايا الدم الحمر والتي بلغت (١٠٠)مايكروليتر (15,14).



شكل رقم(٦) تاثير حجم الانزيم على سرعة التفاعل الانزيمي

يشير الجدول رقم (١)الى ان الايونات المختلفة تمتلك تاثيرا تنشيطيا Activator لانزيمPAO، وان ايون الليثيوم Li^{+1} يمتلك اعلى تاثير حيث ادى الى تحفيز الأنزيم بمقدار(٦٣٣,٢٨) % مقارنة بالسيطرة.

جدول رقم (١): تاثير الايونات المختلفة على فعالية انزيم PAO الخام في نبات الشاي الاخضر

الايون ١٠ملي مولار	الفعالة وحدة انزيمية /مل	الفعالية النسبية %
السيطرة	١٢,٥	١٠٠
Li_2SO_4	٧٩,١٦	٦٣٣,٢٨
$BaCl_2$	٤٣,١٦	٣٥٠
$CaCO_3$	٢٥	٢٠٠
KCl	١٨,٧٥	١٥٠
NaCl	١٦,٦٦	١٣٣,٢٨
$MgCl_2$	١٢,٥	١٠٠

وبهذا تم تثبيت الظروف المثلى لعمل انزيم PAO الخام في نبات الشاي الاخضر في جميع التجارب اللاحقة والموضحة في الجدول رقم (٢).

جدول رقم (٢): مكونات مزيج التفاعل لقياس فعالية انزيم PAO الخام في نبات الشاي الاخضر تحت الظروف المثالية

مكونات التفاعل	Citric acid-NaOH 20mM pH=5 (ml)	Spermine 100mM (ml)	Pottasiume ferricyanide 100mM (ml)	$Li_2SO_4$10mM (ml)	Disttilled water (ml)	Total volume (ml)
اختبار	١	٠,١	٠,٢	٠,٧	٨	١٠
سيطرة	١,١	_	٠,٢	٠,٧	٨	١٠

تنقية انزيم PAO من نبات الشاي الاخضر: ان نتائج التنقية الجزئية لانزيم PAO من نبات الشاي الاخضر موضحة في الجدول (٣) حيث يلاحظ ان الفعالية النوعية للأنزيم الخام (٥,٣٩) وحدة انزيمية/ملغم بروتين ، وان فعالية الانزيم النوعية بعد عملية الترسيب بواسطة كبريتات الامونيوم اصبحت (٧,١٧) وحدة انزيمية /ملغم بروتين ، في حين بلغت الفعالية النوعية بعد عملية الفرز الغشائي (٦,٢٧) وحدة انزيمية /ملغم بروتين .

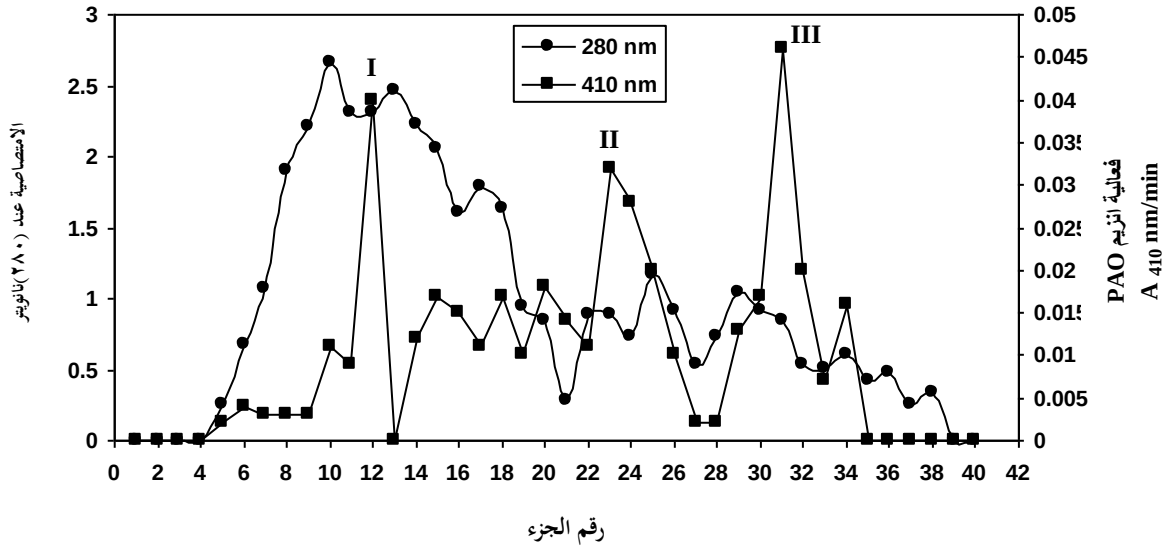
جدول رقم(٣): خطوات تنقية انزيم PAO من نبات الشاي الأخضر

خطوات التنقية	الحجم	تركيز البروتين ملغم/مل	البروتين الكلي ملغم	الفعالية U/مل	الفعالية الكلية* U**	الفعالية النوعية U/ملغم بروتين	الاسترجاع	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	٣٠٠	٦,١٧٥	١٨٥٢,٥	٣٣,٣٣	٩٩٩٩	٥,٣٩	١٠٠	١
الترسيب بالكبريتات-20) 60%)	٧,٥	٦,١	٤٥٧,٥	٤٣,٧٥	٣٢٨١,٢٥	٧,١٧	٣٢,٨١	١,٣٣
الفرز الغشائي	١٠	٥,٩٨	٥٩,٨	٣٧,٥	٣٧٥	٦,٢٧	٣,٧٥	١,١٦
التبادل الأيوني								
PI	١٩	٠,٧٣	١٣,٨٧	٣٧,٥	٧١٢,٥	٥١,٣٦	٧,١٢	٩,٥٢
PII	٧٥	٠,٣٤	٢٥,٥	٢٠,٨٣	١٥٦٢,٢٥	٦١,٢٦	١٥,٦٢	١١,٣٦
PIII	٣٨	٠,٢٧	١٠,٢٦	٣٧,٥	١٤٢٥	١٣٨,٨٨	١٤,٢٥	٢٥,٧٦

* قيست الفعالية كما مبين في الطريقة القياسية المبينة في الجدول رقم(٢).

** الوحدة الأنزيميةU تشير الى كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من المادة ألاساس (السبرمين) في الدقيقة الواحدة.

تشير النتائج اعتماداً على مظهر الروغان Elution profile المستحصل من تنقية انزيم PAO باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose الى وجود ثلاث قمم متميزة شكل(٧) . ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الاولى (peak I) عند حم روغان (٨٤-٧٠) مل وبفعالية نوعية مقدارها (٥١,٣٦) وحدة انزيمية/ملغم بروتين ، بينما ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الثانية (peak II) عند حجم روغان (١٨٢-٩٨)مل وبفعالية نوعية مقدارها (٦١,٢٦) وحدة انزيمية/ملغم بروتين ، في حين ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الثالثة (peak III) عند حجم روغان (٢٣٨-٢٠٣) مل وبفعالية نوعية مقدارها (١٣٨,٨٨) وحدة انزيمية/ملغم بروتين.



الشكل(٧): نموذج الروغان المستحصل من تنقية انزيم PAO لنبات الشاي الأخضر بتقنية التبادل الأيوني وباستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (٤٠×٢,٥)سم والحاوي على المبادل الأيوني السالب DEAE-Cellulose

خصائص متماثلات انزيم PAO :

يوضح الجدول(٤) خصوصية متماثلات انزيم PAO المنقى جزئيا من الشاي الاخضر تجاه مواد الاساس المختلفة اذ لوحظ ان المتماثل I تميز بالفته العالية لاكسدة متعدد الامين سبرمين ، وهذا مشابه لما وجد عليه انزيم PAO المنقى من بذور الحمص والشعير(16,8) بالاضافة الى قابليته الى اكسدة المركب ثنائي الامين بترسين . في حين اظهر المتماثل II الفة عالية تجاه المركب ثنائي الامين بترسين مقارنة بالمواد الاخرى وبهذا فان هذا المتماثل يشبه انزيم PAO المنقى من مصل الامهات الحوامل(19)، بينما اظهر المتماثل III قابلية عالية تجاه اكسدة المركبات

متعددة الامين سبرمين وثنائي الامين كادافرين ولحد ما مركبات احادي الامين وهذا مماثل لانزيم PAO المنقى من طفيلي الاسكارس (20).

جدول رقم(٤) خصوصية متماثلات انزيم PAO المنقى من نبات الشاي الاخضر نحو مواد الاساس المختلفة

المادة الاساس	الفعالية(وحدة انزيمية / مل)					
	I	الفعالية النسبية	II	الفعالية النسبية	III	الفعالية النسبية
سبرمين	٣٧,٥	١٠٠	٢٠,٨٣	٥٨,٨	٣٧,٥	١٠٠
سبرمدين	٠	٠	٦,٢٥	١٧,٦٥	١٨,٧٥	٥٠
كادافرين	٢٩,١٦	٧٧,٧٦	١٦,٦	٤٦,٨٧	٣٧,٥	١٠٠
بترسين	٣٥,٤١	٩٤,٤٢	٣٥,٤١	١٠٠	١٢,٥	٣٣,٣٣
هكسايل امين	٢٢,٩١	٦١	١٨,٧٥	٥٢,٩٥	١٦,٦	٤٤,٢٦
بنزايل امين	٠	٠	٦,٥٥	١٧,٦٥	١٦,٦	٤٤,٢٦
هيدروكسيل امين	٤,١٦	١١	٨,٣٣	٢٣,٥٢	١٠,٤١	٢٧,٧٦

يبين الجدول (٥) نتائج دراسة تاثير بعض المثبطات على فعالية انزيم PAO، وقد اظهرت هذه المركبات تاثيرا تثبيطيا متفاوتا على فعالية الانزيم. ولوحظ ان المثبط صوديوم فلورايد ادى الى تثبيط المتماثلين Iو III تثبيطا كليا لكنه لم يؤثر على المتماثلII مما يعزى مشاركة ايوناً موجباً Mg^{+2} في الفعالية ، وهذا مشابه لانزيم PAO المنقى من كبد الجرذان (21) وكذلك انزيم PAO المنقى من بكتريا *Serratia.marcescens* (22). كما تبين ان فعالية المتماثلات الثلاث قد تاثرت بوضوح بوجود الصوديوم ازايد Sodium azide ، EDTA وايودواسيتاميد Iodoacetamide مما يدل على ان Fe^{+2} ، Cu^{+2} ومجاميع السلفاهيدريل ضرورية لفعالية الانزيم ، وهذا يتفق مع انزيم PAO المنقى من طفيلي الاسكارس *Ascaris suum* (20)، وكذلك انزيمPAO في مصل الأشخاص الطبيعيين والمرضى بالفصام (23) أما المثبط ثايوسيميكاربازيد Thiosemicarbazide فقد ادى الى تثبيط كلا من المتماثلين Iو III ولم يثبط المتماثل II وهذا ماوجد عليه أنزيم PAO المنقى من براعم الشعير(17).

جدول رقم (٥): تاثير بعض المثبطات على فعالية متماثلات انزيم PAO المنقى من نبات الشاي الاخضر

المثبط (1)mM	التاثير التثبيطي %		
	I	II	III
صوديوم فلورايد	١٠٠	٠	١٠٠
صوديوم ازايد	٨٨,٨٨	٨١,٨١	٧٢,٢٢
ايودواسيتاميد	٥٠	٥٤,٥٤	٦١,١١
EDAT	٤٤,٤٤	٤٥,٤٥	١٠٠
ثايوسيميكاربازيد	٧٧,٧٧	٠	٥٠

المصادر

1. Chattopadhyoy M.K. and Ghosh B. (1998), Molecular analysis of polyamine biosynthesis in higher plant, Curv. Sci., Vol. 74 (16), pp517-522.
2. Agostinelli E., Arancia G., Dala L.V., Belli F., Marra M., Salvi M. and Toninello A. (2004), The biological function of polyamine oxidation products by amine oxidases: Perceptive of clinical applications, Aminoacids J., Vol. 27, PP 347-358.
3. Rajam M.V. (1997), Polyamines. In: plant ecophysiology, Prasad M.N.V.(ed.) New York. pp 343-374.
4. Borrell A., Bestford R.T., Altabella T., Masgran C. and Tiburcio A.F. (1996), Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. Physiol. Plant, Vol. 98, pp. 105-110.
5. Zheliaskova A., Naydenova S. and Petrve A.G. (2000), Introduction of phospholipids bilayer with ployamines of defferent length, Eur. Biophys., Vol. 29, pp. 153- 157.
6. Bograh A., Gingras Y., Tajmir R.H. and Corpentive R. (1997), The effects of spermine and spermidine on the structure of photo system II proteins relation to inhibition of electron transport, FEBS Lett.,Vol.402(1), pp. 41- 44.
7. Flayeh K.A., Najafi S., Al-Delymi A. and Halar M. (1984), 1,3 - Diaminopropane (cucumber), Phytochem., Vol.23, pp. 989-990.
8. Federico R., Angilini R., Cona A. and Niglio A. (1992), Polyamine oxidation bound to cell walls from *zeamays* seedlings, Phytochem. Oxford. Vol.31(89), pp. 2955-2957.
9. Li Z.C. (1993), Rapid purification of polyamine oxidase from oat primary leaves, Phytochemistry Oxford. New York: Pergamon Press, Vol. 34 (3), pp. 611- 612.
10. عبد المانع، خالد صالح عمر (٢٠٠١)، عزل البروتينات والاجزاء غير البروتينية في نباتي السبحبح وخس الزيت ودراسة تأثيرها على مستوى السكر في الدم. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، موصل، العراق.
11. Lowrey O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951), Protein measurements with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., Vol. 193, pp. 256-275.

12. Scharecterle G.R. and Pollack R.L. (1973), Simplified method quantitative assay for small amounts of proteins in biological materials, Anal. Biochem., Vol. 51, pp 645-655.
13. Flayeh K.A. (1988), Spermidine oxidase activity in serum of normal and schizophrenic subjects , Clin. Chem., Vol.412, pp. 401-403.
١٤. الكاتب، سميرة محمد يحيى (٢٠٠٠)، وجود وخصائص متماثلات انزيم بولي امين اوكسيديز في الحليب والسائل المخي الشوكي. اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل، موصل، العراق.
١٥. الجبوري، طارق سليمان محمود علي (٢٠٠٢)، خصائص انزيم بولي امين اوكسيديز وعلاقته مع فيتامين C في خلايا الدم الحمر للأشخاص المصابين بالفصام. رسالة ماجستير ، كلية التربية / جامعة الموصل، موصل، العراق.
16. Cervelli M., Cana A., Angelini R., Paticelli F., Fedrico R. and Mariottini P. (2001), A barley polyamine oxidase isoform with distinct structural features and subcellular localization, Eur. J. Biochem., Vol. 268(13), pp. 3816-3830.
17. Smith T.A. (1971), Purification and properties of polyamine oxidase of barley plants, Phytochemistry. Vol. 11, pp. 899-910.
18. Flayeh K.A. (1998), Properties and role of polyamine oxidase activity in cell growth of human colonic carcinoma cell line, Raf. J. Sci., Vol. 9(2), pp. 25-33.
19. Gahal W.A., Vale A.M. and Pitot H.C. (1982), Spermidine oxidase in human pregnancy serum, Biochem. J., Vol. 201, pp.161-166.
20. Muller S. and Walter R.D. (1992), Purification and characterization of poly amine oxidase from *Ascaris Suum*, Biochem.J. London.The Biochemical Socity. Vol. 83(1), pp. 75-80.
21. Holtta E. (1977), Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: Purification and properties of polyamine oxidase, Biochemistry, Vol. 16, p. 91.
22. Tabor C.W. and Kellogg P.D. (1970), Identification of flavin adinine inucleotide and heme in a homogeneous spermidine dehydrogenase from *Serratia marcescens*, J. Biol. Chem. Vol 245 (20), pp. 5424- 5433.
23. Flayeh K.A., AL-Saffar N.M. and Ismail M.K. (1994), Characteristics of spermin oxidase from sera of schizophrenic and normal subjects, The Arab J. of Psychiatry, Vol. 5, pp. 23-30.

Occurrence and Properties of Polyamine Oxidase Isoenzymes in Green Tea *Camelli sinensis* Plant

O.Y. AL-Abbasi[1] , M.B.Alsaadon[2] , S.A.AL-Bajari[3]

[1] *Chem. Dept., College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq*
[2] *Chem. Dept., College of Science , University of Mosul , Mosul , Iraq*
[3] *Pathological Analytics , Technical Institute , Mosul , Iraq*

(Received 20 / 2 / 2007, Accepted 16 / 5 / 2007)

Abstract

The research included the detection of Polyamine oxidase (PAO) activity in Green Tea(*Camellia sinensis*) plant. Optimal conditions for crude PAO activity were determined in plant using spermine as substrate . PAO activity was found to be proportional with time of reaction up to(120)sec. The maximum activity was obtained by using Citric acid - NaOH buffer solution at pH=5, Incubation time (5)min, temperature (30)C^{o} and(250)microlitre . By using Linweaver-Burk plot, it was found that Vmax to be (88.33)enzyme unit/ml and the Km value to be (2)mM with spermine as substrate . Li^{+1} was the most potent activator for PAO activity, it activated enzyme by 633.28% PAO was purified from GreenTea plant by the extraction with distilled water and by using precipitation with ammonium sulphate, dialysis and anion exchange chromatography (DEAE-Cellulose). Three PAO isoenzymes I, II and III were obtained, with specific activity of 51.36, 61.26 and 138.88 enzyme unit/ml protein respectively and with purification fold of 7.12, 15.62, and 14.25 respectively, compared to crude enzyme. Some properties of partially purified PAO isoenzymes were studied , I and III isoensymes were found to have ahigh affinity toward polyamine, spermine, however II isoenzyme toward diamin, putrescine. Sodium floride was found to inhibit completely the activity of I and II isoenzymes . no effected on II isoenzymes activity. Thiosemecarbazide showed different inhibitory effect on II isoenzymes activity.